

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学 号: 21620071151963

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

粘细菌的分离、纯化和活性物质的筛选

Study on the Isolation, Purification and

Bioactivity Screening and Secondary Metabolites of

of Myxobacteria

任闪闪

指导教师姓名: 钱 晓 鸣 教授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2010 年 月

论文答辩日期: 2010 年 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2010 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密 ( ), 在          年解密后适用本授权书。

2、不保密 ( )

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名:

日期:          年    月    日

导师签名:

日期:          年    月    日

## 摘要

粘细菌是革兰氏阴性滑行细菌，它以复杂的多细胞社会学行为及产生结构新颖种类丰富的生物活性物质而著称。至今研究者已经从粘细菌次级代谢产物中鉴定了 100 种以上的基本化学结构和 600 多种结构衍生物，约占微生物来源活性物质总数的 3.5%。其中纤维堆囊菌属是粘细菌中唯一能够降解纤维素的生物类群，尤其令人感兴趣的是该属菌株能够产生 Disorazol, Chivosazol, Soraphen, 埃博霉素 (Epothilone) 等丰富的次级代谢产物。而且在粘细菌的 17 个属所产生的次级代谢产物种类中，纤维堆囊菌属的次级代谢产物可达到 48.4%。

本论文对采集自河南，重庆，广东，辽宁，新疆，云南，山东和厦门的 243 个土样进行分离，共分离到包括粘球菌属 (*Myxococcus*)，珊瑚菌属 (*Corallococcus*)，软骨霉状菌属 (*Chondromyces*)，纤维堆囊菌 (*Sorangium*)，小囊菌属 (*Nannocystis*)，孢囊杆菌属 (*Cystobacter*) 在内的 138 株粘细菌，并对已经纯化的菌株进行了分子鉴定。对于稀有的软骨霉状菌和小囊菌的分离纯化方法进行了探索，并进一步对孢囊杆菌的验纯方法进行了改进。

由于纤维堆囊菌属在次级代谢产物方面的突出药用价值，本论文着重予以研究，其中初步探索了提高纤维堆囊菌分离纯化效率的方法——对纤维堆囊菌的子实体进行抗生素处理法，洗涤法与高温水浴法相结合，以及部分营养要求特殊的纤维堆囊菌 (XMU-So-57) 的液体发酵模式的尝试，并进行了固体和液体发酵，同时对其发酵粗提物进行了初步分离，从纤维堆囊菌中分离到一个脂肪酸。

以枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* CMCC63501)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* CMCC4103)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* CMCC26003)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus* CMCC63202)、白色假丝酵母 (*Candida albicans* As2538) 和黑曲霉 (*Aspergillus niger* ACCC30005) 为指示菌，采用滤纸片法对 41 株在液体培养基中生长良好的菌株进行抗菌活性检测，所分离的粘细菌大多数具有抗金黄色葡萄球菌、短小芽孢和枯草芽孢杆菌等革兰氏阳性菌的活性，但活性都较弱；其中只有一株 XMU-So-55 对白色假丝酵母和黑曲霉均有抗性，且抑菌圈远远大于庆大霉素的抑菌圈。

采用 MTT 法对其体外抗肿瘤活性进行检测,发现大部分粘细菌都对 HeLa(人子宫癌细胞)和 HepG-2(人肝癌细胞)具有抑制作用,其中有 8 株粘细菌的粗提物在 100  $\mu\text{g/mL}$  的浓度时对 HeLa(人子宫癌细胞)的抑制率在 60%以上,占测试菌株数的 19.5%;有 5 株粘细菌的粗提物在 100  $\mu\text{g/mL}$  的浓度时对 HepG-2(人肝癌细胞)的抑制率在 60%以上,占测试菌株数的 12.2%,对比发现有 4 株菌对 HeLa(人子宫癌细胞)和 HepG-2(人肝癌细胞)均有显著的抑制作用。

埃博基因片段的扩增可作为一种高通量筛选手段,从分离的大量未知纤维堆囊菌中筛选出含有埃博霉基因的菌株,缩短筛选时间,提高了筛选效率。

本文结果表明,粘细菌尤其是纤维堆囊菌包含大量的抗菌和抗肿瘤活性的菌株,其中部分菌株具有显著的抗菌和抗肿瘤活性,同时也蕴藏着丰富的结构新颖的活性物质,因此进一步研究粘细菌可以为开发新的抗菌、抗肿瘤药物奠定基础。

关键词:粘细菌;分离纯化;活性筛选

## Abstract

Myxobacteria are Gram-negative gliding bacteria that are noted for the complicated multicellular social behavior and the excellent ability to produce various bioactive compounds. In the past two decades, about 100 basic structures and 500 structural variants have been discovered in myxobacteria and have been fully characterized, which account for about 3.5% of the presently known secondary metabolites of microbial origin. Nearly all of the *Sorangium* strains produce some types of secondary metabolites with diverse biological activities. *Sorangium* is the only cellulose-degrader among all of the 17 myxobacterial genera but the producer of almost half of the secondary metabolites isolated from myxobacteria.

In this thesis, Myxobacteria were isolated from the soil samples collected in Henan, Chongqing, Guangdong, Liaoning, Xinjiang, Yunnan, Shandong and Xiamen. Total of 138 strains are isolated. Through molecular identification by comparing the 16S rDNA sequences with those in online database, all isolated Myxobacteria strains were determined to belong to the genera *Myxococcus*, *Corallococcus*, *Chondromyces*, *Sorangium*, *Nannocystis* and *Cystobacter*. The isolation and purification methods are explored for *Chondromyces* and *Nannocystis*, and improved for *Cystobacter*.

This thesis invented an isolation and purification method for the genus *Sorangium* by treating the fruiting bodies with antibiotics and then washing and heating. Liquid media are screened for obtaining improved growth rate of *Sorangium* strains. The chemical components of *Sorangium* XMU-So-57 is isolated and purified from the solid and liquid fermentation products, however, only one fatty acid was obtained.

In antimicrobial assays, most of the isolates only showed weak activities against one or more indication microbes (*Bacillus Subtilis* CMCC63501,

*Bacillus pumilus* CMCC63202, *Escherichia coli* CMCC4103, *Staphylococcus aureus* CMCC26003, *Candida albicans* As 2538, *Aspergillus niger* ACCC 30005). However, the strain XMU-So-55 showed outstanding inhibitory activities against *Candida albicans* As 2538 and *Aspergillus niger* ACCC 30005.

In antitumor assays, most of the strains (41) showed inhibitions against the growth of HeLa and HepG-2 cell lines. At 100 µg/mL, the extracts of 8 strains inhibited more than 60% of the growth of HeLa cells, 5 strains inhibit more than 60% of the growth of HepG-2 cells including 4 strains showed the same inhibitory activities against both HeLa and HepG-2 cells.

PCR amplifications of the biosynthetic genes of epothilones were used for screening, indicating that 5 strains have the potential of producing epothilones.

This study revealed that isolates of the genus *Sorangium* have antimicrobial and antitumor activities, which might be new sources for novel compounds with good biological activities, and deserves further studies.

Key words: Myxobacteria; *Sorangium*; isolation; purification; bioactivity screening.

## 目 录

摘 要	I
ABSTRACT	III
目 录	V
1. 前 言	VII
1.1 粘细菌概述	1
1.2 粘细菌的分类	1
1.3 粘细菌的分布	5
1.4 粘细菌的细胞行为——子实体和粘孢子的形成	6
1.4.1 粘细菌的生长周期	6
1.4.2 粘细菌的子实体及粘孢子	6
1.4.3 子实体结构的形态发生	8
1.5 粘细菌产生的活性物质及其作用机制	9
1.5.1 粘细菌所产生活性物质的特点	12
1.5.2 粘细菌产生的生物活性物质的作用机制	15
1.6 纤维堆囊菌	16
1.6.1 纤维堆囊菌的营养要求	17
1.6.2 纤维堆囊菌细胞的运动特点	18
1.6.2 纤维堆囊菌的形态特征	18
1.6.3 纤维堆囊菌的生长史	19
1.6.4 纤维堆囊菌的次级代谢产物	21
1.7 本课题的研究目的及意义	25
2. 材料与方法	28
2.1 材料	28
2.1.1 样品	28
2.1.2 生物活性测定指示菌	28
2.1.3 粘细菌分离、纯化、发酵及活性测定培养基	28



2.1.4 细胞培养基	32
2.1.5 抗肿瘤活性测试常用肿瘤细胞株	32
2.1.6 细胞培养及细胞毒活性测试	32
2.1.7 分子鉴定所用试剂	32
2.1.8 次级代谢产物分离纯化中常用显色剂	33
2.1.9 化合物的分离纯化和结构测定中常用的溶剂	33
2.1.10 常用仪器	33
2.1.11 主要试剂及耗材	34
2.2 方法	34
2.2.1 技术路线	34
2.2.2 土样采集的标准及初步处理	35
2.2.3 各种属粘细菌的分离	35
2.2.4 菌株的分子生物学鉴定	39
2.2.5 菌株的抗肿瘤活性测定	43
2.2.6 抗菌活性测定	43
2.2.7 菌株发酵及粗提物的提取	44
2.2.8 天然产物的分离纯化方法	45
<b>3. 结果与讨论</b>	<b>48</b>
3.1 粘细菌的分离纯化	48
3.1.1 土样的采集与选择	48
3.1.2 菌株的分离纯化	51
3.1.3 纤维堆囊菌在混合培养基中的生长状态	53
3.2 粘细菌的固体发酵	54
3.2.1 孢囊杆菌 XMU-Cb-02 固体发酵物的分离纯化	54
3.2.2 纤维堆囊菌 XMU-So-57 固体发酵物的分离纯化	55
3.3 粘细菌抗菌活性的测定	58
3.4 粘细菌抗肿瘤活性的测定	61
3.5 粘细菌菌株鉴定结果	65
3.6 粘细菌埃博基因片段的测定	65

4. 结论与展望 .....	70
参考文献 .....	74
附 录 .....	80

厦门大学博士论文摘要库

## Catalogue

<b>Abstract</b>	<b>I</b>
<b>1. Inroduction</b>	<b>VII</b>
1.1 Overview of myxobacteria	1
1.2 Taxonomy of myxobacteria	1
1.3 The habitats of myxobacteria	5
1.4 The cell behavior of myxobacteria ——the formation of fruiting bodies and myxospores	6
1.4.1 The growth cycle of myxobacteria	6
1.4.2 The fruiting bodies and myxospores of myxobacteria	6
1.4.3The morphogenesis of fruiting bodies	8
1.5 Myxobacterial bioactive compounds and their mechanism	9
1.5.1 The Characteristics of myxobacterial bioactive compounds	12
1.5.2 The mechanism of myxobacterial bioactive compounds	15
1.6 Sorangium cellulosum	16
1.6.1 Nutritional requirements of Sorangium cellulosum	17
1.6.2 Behavior characteristics of Sorangium cellulosum	18
1.6.2 Morphology of Sorangium cellulosum	18
1.6.3 Life cycle of Sorangium cellulosum	19
1.6.4 secondary metabolites of Sorangium cellulosum	21
1.7 Purpose, significance and content of this thesis	25
<b>2. Materials and methods</b>	<b>28</b>
2.1 Materials	28
2.1.1 Sample	28
2.1.2 Indicative microbes	28
2.1.3 Culture medium for Indicative microbes and Isolation, purification and fermentation of myxobacteria	28

2.1.4 Culture medium for cell.....	32
2.1.5 Cell for antitumor test.....	32
2.1.6 Cell culture and cytotoxicity test.....	32
2.1.7 Reagent for molecular identification.....	32
2.1.8 Chromogenic reagents for secondary metabolites isolation.....	33
2.1.9 Chemicals for purification and structure analysis.....	33
2.1.10 Apparatus.....	33
2.1.11 Reagent and other materials.....	34
<b>2. 2 Methods .....</b>	<b>34</b>
2.2.1 Technology roadmap .....	34
2.2.2 Collection and Treatment of soil samples Sorangium cellulosum .....	35
2.2.3 Isolation of myxobacteria .....	35
2.2.4 Identification of strains .....	39
2.2.5 Antitumor test.....	43
2.2.6 Antimicrobial test.....	43
2.2.7 Fermentation and extraction of strain .....	44
2.2.8 Purification of natural product .....	45
<b>3. Results and analysis .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Isolation and purification of myxobacteria.....</b>	<b>48</b>
3.1.1 Collection and selection of soil sample .....	48
3.1.2 Isolation and purification of strains.....	51
3.1.3 Growth state of Sorangium in the mixed medium .....	53
<b>3.2 solid fermentation of myxobacteria .....</b>	<b>54</b>
3.2.1 Isolation and purification of XMU-Cb-02 secondary metabolites .....	54
3.2.2 Isolation and purification of XMU-So-57 secondary metabolites .....	55
<b>3.3 Antimicrobial test of myxobacteria .....</b>	<b>58</b>
<b>3.4 Antitumor test of myxobacteria.....</b>	<b>61</b>
<b>3.5 Identification of myxobacteria .....</b>	<b>65</b>
<b>3.6 Epothilone Genes test of myxobacteria.....</b>	<b>65</b>

<b>4. Conclusion and Prospect .....</b>	<b>70</b>
<b>References .....</b>	<b>74</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>79</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>80</b>

厦门大学博硕士论文摘要库

## 1. 前言

### 1.1 粘细菌概述

粘细菌是一类可滑行运动的单细胞革兰氏阴性细菌<sup>[1]</sup>, 属于变形细菌门紫细菌的  $\delta$  分枝 (*Phylum Proteobacteria, Class IV. Deltaproteobacteria, Order VIII. Myxococcales*)。是最高等的原核生物类群, 其营养细胞一般为  $0.4 \times 1.5 \mu\text{m} \sim 2 \times 15 \mu\text{m}$ , 因种属不同而差别较大<sup>[2]</sup>, 并能在固体表面做滑行 (或匍匐) 运动, 多数粘细菌的营养细胞是杆状, 在贫瘠的固体培养基上能以粘性分泌液彼此结合成薄而扩散的菌膜。多数为有规律的同心叠加或呈放射状的线条, 纤维堆囊菌则更倾向于形成树枝状的不规则菌膜, 有些种属有时由于细胞的运动, 菌落迅速覆盖培养基表面, 形成薄而致密的菌膜, 比如抱囊杆菌属。粘细菌大多生长在土壤中、枯枝上或食草动物的粪便上, 有的能分解纤维素。粘细菌能特征性地产生胞外多糖黏液, 不产光合色素, 但常产生类胡萝卜素、叔糖苷类、黑素和原卟啉色素, 因此通常具有鲜艳的颜色, 它广泛存在于各类土壤中, 中性和偏碱性土壤更适宜其生长, 据估计每克中性或微碱性土壤中约有 450,000 个细胞, 而每克腐败物中含有 500,000 多个细胞<sup>[3]</sup>。通常一小撮的土样可分离出 4, 5 种粘细菌<sup>[4]</sup>。

粘细菌之所以引起越来越多的关注, 主要是它可以产生丰富的次级代谢产物, 而其中生物活性物质产生能力最高的类群是纤维堆囊菌<sup>[5]</sup>。它能够产生降解不易溶解的大分子和分解真细菌的酶类, 种类丰富而多样, 如降解蛋白的酶类、降解淀粉的酶类、降解纤维素的酶类、降解脂肪的酶类、降解几丁质的酶类、降解果胶的酶类等, 而这些可能是重要的工业开发大分子降解酶的来源<sup>[4]</sup>。其中目前降解纤维素的酶主要集中在真菌上, 而粘细菌产生纤维素酶的能力使纤维素酶的研究范围更加广泛。目前粘细菌的研究工作已涉及分子生物学、发育生物学、生物技术及生物活性物质等多个领域<sup>[6, 7]</sup>。

### 1.2 粘细菌的分类

如表 1 所示, 根据 16S rDNA 的序列分析结果, 已发现的粘细菌分为 2 个亚

目：孢囊杆菌亚目 (*Cystobacterineae*) 和堆囊菌亚目 (*Sorangineae*)，目前已发表的有 17 个属 50 个种，分别为：囊球菌属 (*Angiococcus*)，粘球菌属 (*Myxococcus*)，珊瑚球菌属 (*Corallococcus*)，原囊菌属 (*Stigmatella*)，单囊 (*Archrangium*)，孢囊杆菌属 (*Cystobacter*)，蜂窝囊菌属 (*Melittangium*)，标桩菌属 (*Polyangium*)，堆囊菌属 (*Sorangium*)，小囊菌属 (*Nannocystis*) *Hyalangium*, *Byssophaga Jahnica*, *Haliangium*, *Kofleria*。其中单囊菌尚不能人工培养。

表 1 根据 16S rDNA 对粘细菌进行的分类<sup>[2]</sup>

Table 1 The taxonomy of Myxobacteria by 16S rDNA <sup>[2]</sup>

孢囊杆菌亚目 ( <i>Cystobacterineae</i> )	粘球菌科 ( <i>Myxococcaceae</i> )	囊球菌属 ( <i>Angiococcus</i> )
		粘菌属 ( <i>Myxococcus</i> )
		珊瑚球菌属 ( <i>Corallococcus</i> )
		原囊菌属 ( <i>Archrangium</i> )
	孢囊杆菌科 ( <i>Cystobacteraceae</i> )	孢囊杆菌属 ( <i>Cystobacter</i> )
		蜂窝囊菌属 ( <i>Melittangium</i> )
		标桩菌属 ( <i>Stigmatella</i> )
		<i>Hyalangium</i>
		单囊菌属 ( <i>Haploangium</i> )
		软骨霉状菌属 ( <i>Chondromyces</i> )
堆囊菌亚目 ( <i>Sorangineae</i> )	多囊菌科 ( <i>Polyangiaceae</i> )	多囊菌属 ( <i>Polyangium</i> )
		堆囊菌属 ( <i>Sorangium</i> )
		<i>Byssophaga</i>
		<i>Jahnica</i>
	小囊菌科 ( <i>Nannocystaceae</i> )	小囊菌属 ( <i>Nannocystis</i> )
	<i>Haliangiaceae</i>	<i>Haliangium</i>
	<i>Kofleriaceae</i>	<i>Kofleria</i>

根据《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》(第 9 版) 的粘细菌分

类标准，主要以形态特征确定菌株归属<sup>[9]</sup>（如表 2）。根据细胞形态、粘孢子形成、特征性的菌落结构、子实体形态以及黏液的化学组成不同，尤其是营养细胞可分为两端削尖、细长的杆状和两端钝圆的圆柱形。前一种营养细胞的粘孢子，缩成杆状或球形，并有外壁层包裹；后一种营养细胞的粘孢子形态与其营养细胞相似，且总是包在孢子囊内；根据营养细胞和粘孢子的形态，将粘细菌分为两大类群，即两个亚目：孢囊杆菌亚目和堆囊杆菌亚目，其中堆囊杆菌亚目又分为两个亚群，它们构成了粘细菌的三大分支结构。其中大的分支孢囊杆菌亚目包括孢囊杆菌属、囊球菌属、原囊菌属、蜂窝囊菌属和标桩菌属，其中珊瑚球菌属属于粘球菌科；第二分支包括软骨霉菌属和多囊菌属的纤维多囊菌菌株；第三分支包括小囊菌属和多囊菌属的卵黄状多囊菌菌株<sup>[10]</sup>。有趣的是孢囊杆菌亚目和堆囊杆菌亚目两个亚目的分界线恰好也是其次级代谢产物种类的分界线，目前在这两个亚目中发现的次级代谢产物还没有交叉的部分，这意味着存在反映亲缘关系的生理学特征有可能被用作粘细菌生理生化分类的依据。

表 2 已培养的粘细菌各属菌株的主要特征<sup>[12]</sup>

Table 2 Morphologies of Myxobacteria strains cultured

属名	子实体	营养细胞	粘孢子	菌落
粘球菌属 ( <i>Myxococcus</i> )	球形隆起，下端有或长或短的柄支撑，浅黄色、黄色、橙色、红色、棕色	细长，末端尖，长 2~10 $\mu$ m	椭圆或卵圆形，表面光滑，直径 1~2 $\mu$ m	菌膜不发达，大量子实体呈蔓延辐射状分布
珊瑚球菌属 ( <i>Corallococcus</i> )	不规则，可见珊瑚状分支，嵌于琼脂表面或内部，橙黄色、橘红色	细长，末端尖，长 3.5~7 $\mu$ m	椭圆或卵圆形，直径 1.0~2.5 $\mu$ m	菌膜不发达，大量子实体的分布呈明显的辐射线
原囊菌属 ( <i>Archrangium</i> )	不规则，脑状或肠状，常有指状突起，颜色随发育加深	细长，末端尖，长 4~12 $\mu$ m	豆形或几乎球形，直径 1~2 $\mu$ m	薄而扩展，表面通常密实，具有长的辐射状线
孢囊杆菌属 ( <i>Cystobacter</i> )	聚集生长，嵌于琼脂表面或内部，大型，椭圆球或长形，褐色，亮	细棒状，末端尖，长 4~15 $\mu$ m	椭圆或短粗的杆状，1.1~1.8 $\times$ 1.8~4 $\mu$ m	大型致密的薄膜，有明显辐射线，菌膜通常覆盖整个平板



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库